(19)日本国特許庁（JP）　(12) 公表特許公報（A）　(11)特許出願公表番号

特表平7－507558

(43)公表日　平成7年(1995)8月24日

第3部門第2区分

(51)Int.Cl.⁶		識別記号	庁内整理番号	FI	
A61K	35/14	Z	7431－4C		
	38/16				
	38/22				
			8314－4C	A61K	37/04
			8314－4C		37/24

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全 10 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6－501176
(86)(22)出願日　平成5年(1993)6月7日
(85)翻訳文提出日　平成6年(1994)12月5日
(86)国際出願番号　PCT／FR93／00544
(87)国際公開番号　WO93／25215
(87)国際公開日　平成5年(1993)12月23日
(31)優先権主張番号　92／06826
(32)優先日　1992年6月5日
(33)優先権主張国　フランス（FR）
(81)指定国　EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US

(71)出願人　イノテブ
フランス国、56920　セン－ゴンリー、レゲリノール（番地なし）
(71)出願人　デルマス、オリビエ、マルセル、ジョセフ
フランス国、37250　モンバゾン、リュベルビュ　14
(72)発明者　デルマス、オリビエ、マルセル、ジョセフ
フランス国、37250　モンバゾン、リュベルビュ　14
(74)代理人　弁理士　松井　光夫

(54)【発明の名称】　活性化された血小板の上清の製造装置並びに該装置を用いる方法及び得られた上清

(57)【要約】

血小板因子の調製方法並びにヒト又は動物由来の血小板を活性化するための装置。血小板因子の溶液を得るための該方法は、血小板を血小板活性化溶液に接触させることによる血小板を活性化する工程を含み、そして活性化段階の間に血小板より放出された血小板因子の溶液が集められる。該方法は、血小板の懸濁液を含む液体を、血小板を保持できるフィルターに通過させ、活性化溶液をフィルター上に保持された血小板に加え、そして、溶液中に血小板因子を含む濾液を濾液により分離し、一方、血小板はフィルター上に保持されたままである、ことを特徴とする。

BEST AVAILABLE COPY

請求の範囲

1．血小板活性化剤溶液に接触させることによる血小板の活性化の段階を含み、活性化段階の間に血小板から放出される血小板因子の溶液を集める方法において、

血小板の懸濁物を含む液体を血小板を保持できるフィルターに通過させ、フィルター上に保持された血小板に活性化剤溶液を加え、そして溶液中に血小板因子を含む濾液を濾過により分離し、一方、血小板はフィルター上に保持されていることを特徴とする方法。

2．活性化された溶液を添加する前に、適当な洗浄液をフィルター上に保持された血小板に加えること、及び洗浄液を濾過により取り除くことを特徴とする請求の範囲第１項記載の方法。

3．閉鎖系の形態で、血小板懸濁物を含む液体から始めて、血小板を活性化し、そして、滅菌された状態で血小板因子の溶液を得ることができる装置において、

血小板を保持できるフィルターを有する濾過手段を含み、該フィルターは囲い中に配置され、該囲い中で上流部及び下流部の境界を画し、該囲いの上流部は、開始液を含む貯留部に該上流部を連結しているか又は連結可能にする、適当な開閉手段を備えた少なくとも一つの管と連結されており、そして該囲いの下流部は開始液の濾液及び該血小板因子の溶出液を選択的に集めることを可能にする、適当な開閉手段を備えた少なくとも一つの管と連結されており、かつ、血小板活性化剤を含む貯留部を更に含み、該貯留部は、溶液の状態で活性化剤を上流部に導入できるように上流部に連結されているか又は連結されることができることを特徴とする装置。

4．上流部に連結している少なくとも一つの管が、フィルター上に保持された血小板を洗浄するための液体を含む貯留部に連結されているか又は連結されることができ、かつ下流部に連結している少なくとも一つの管が洗浄液の濾液を別に集めることを可能にすることを特徴とする請求の範囲第３項に記載の装置。

明細書

活性化された血小板の上清の製造装置
並びに該装置を用いる方法及び得られた上清

本発明は、血小板因子（血小板顆粒の中身である）の調製方法並びに短時間で、外部からの汚染の危険なしに、生物活性を有する可溶性分子を得るために、重合体構造の上或いは中に置かれている、人又は動物由来の血小板を活性化する装置に関する。

活性化された血小板（プレートレットとも言う）によって放出される血小板因子の溶液は、しばしば、"活性化された血小板の上清"という表現で示される。

活性化された血小板の上清は、現在、生物分子、例えば、血小板由来成長因子、トランスフォーミング成長因子-β、塩基性線維芽細胞成長因子、血小板第４因子、血小板由来内皮細胞成長因子、ヘパリン結合性表皮細胞成長因子、インシュリン様成長因子１、結合組織活性化ペプチドIII、β-トロンボグロブリン、表皮細胞成長因子、プラスミノーゲン、フォンウィルブランド因子、フィブリノーゲン、セロトニン、ヒスタミン、アデノシン　ジ・及びトリ・リン酸、フィブロネクチン、ビトロネクチン、血小板第XIII因子、蛋白分解性或いは糖分解性酵素、又はアラキドン酸の代謝産物（以下のレビューを参照、炎症及び修復、B.L.Wong アンド S.M.Wahl 、"ペプチド成長因子及びそれらのレセプター"、第510頁、Sporn アンド Roberts編 Springer-Verlag, Berlin、血小板及び損傷に対する応答、R.A. Terkeltaub アンド M.H. Ginsberg、"創傷修復の分子及び細胞生物学"、第38頁、Clark アンド Henson 編、Plenum Press, New York)の精製のための開始物質として用いられている。

ある種の精製方法が公知であり、そして、特許出願の主体となり得た。特に、トランスフォーミング成長因子-βの精製に関するヨーロッパ特許第８９１００１４８．９号、血小板由来成長因子の精製に関する米国特許第４４７９８９６号明細書に注目されたい。

活性化された血小板の上清（又は、これらの上清の画分）は、例えばそれらの治癒活性故に、治療に用いられることができ(D.Knightonら、Ann. Surg., 1982年、第196巻、第379～388頁、D.M. Carterら、創傷治癒における成長因子及びその他の特徴"、第303～317頁、Barbul, Pines, Cadwell, Hunt編、Alan R. Liss Inc., New York, 1988年、米国特許第４７６０１３１号明細書、国際公開ＷＯ８８／０３４０９、ＷＯ８６／０３１２２及びＷＯ８９／０５６５６号公報）、又はたとえばそれらの脱毛を調節する有益な効果故、化粧品において用いられることができる（国際公開ＷＯ９０／０７９３１号公報）。

活性化された血小板の上清中に含まれる血小板因子は、特に、潰瘍の治療に用いることができる。

血小板の上清の調製のために現在までに報告されている

方法は、大変長く（[illegible]時間で約1時間30分）、退屈なものであり（試験管から試験管への移動、バランス調製された遠心分離や、ピペッティングが要求されるので）、自動化が実質的に不可能であり、そして、その環境（開口された容器中の液体の移動）による生成物の汚染、又は取り扱われる生成物（伝染性の病原菌により感染されているということがありうる）による作業者の危険がある。

事実、これらの調製法は、順次の遠心分離により、血液から血小板を単離することから始まる。次いで、血漿を除去するため血小板を遠心分離により洗浄する（血小板の単離は、Method in Enzymology, 第169巻、第1章、第3～27頁、Hawiger 編、Academic Press, London, 1989年、国際公開WO86／03122号公報、米国特許第4760131号明細書にある）。次に、精製した血小板を活性化剤の存在下で懸濁する。多くの活性化剤が公知である（血小板及び損傷に対する応答、R.A. Terkeltaub アンド M.H. Ginsberg, "損傷修復の分子及び細胞生物学" 第35～55頁、Clark アンドBenson編、Plenum Press, New York）。3つのタイプの活性化剤が区別される：すべての顆粒からの分泌を誘導することができる強力な活性化剤（トロビン、コラーゲン、カルシウムイオン運搬担体A23187）、中間の活性化剤、例えばトロンボキサンA2、カルシウムイオン存在下或いは不存在下でのADP又はアドレナリン、そして顆粒の分泌を誘導しない弱い活性化剤（セトロニン）である。最もよく用いられる活性化剤はトロンビンである。

その他の活[illegible]方法は、継続的な凍結／解凍又は超音波による血小板の溶解のための物理的方法を用いたものである。血小板膜及び他の不溶性成分を除くために、血小板の上清を遠心分離及び／又は濾過により清澄する。

加えて、慣用の方法においては、血漿由来の汚染物質を除くことは困難であり、そして、これらの血漿汚染物質を除くことを目的とした連続洗浄は、血小板の損失又は血小板の部分的活性化により血小板由来の分子の収率の減少を招く。最後に、血小板が懸濁されているところの血漿を、他の用途のために回収することは困難である。

本発明は、血小板の上清の調製において現在の方法に固有の上記の問題、例えば汚染の危険、収率の損失及び長時間でしかも問題のある操作の必要性、を解決することを可能にする。

本発明の主体は、血小板活性化剤溶液に接触させることによる血小板の活性化の段階を含み、活性化段階の間に血小板から放出された血小板因子の溶液を集めることを含む、血小板因子の溶液を得るための方法であって、該方法は、血小板の懸濁物を含む液を血小板を保持できるフィルターに通過させ、フィルター上に保持された血小板に活性化剤溶液を加え、そして溶液中に血小板因子を含む濾液を濾過により分離し、一方、血小板はフィルター上に保持されていることを特徴とする。

フィルター上で活性化を行うことにより血小板の活性化を調節する試みは自明ではないということを指摘しておく。なぜなら、フィルター上での血小板の自発的活性化が、通常予想されるからである。例えば、J.N. Lindon ら、Methods in Enzymology, 第169巻、第104～107頁、1989年を参照。

実際のところ、先行技術は、慣用の遠心分離法に代えて単純な濾過を行うことを示唆していない。これは濾過に対する先入観が存在し続けたためと考えられる。つまり、濾過は血小板の早期の、自発的活性化を引き起し、血小板因子の精製すなわち、血漿の構成成分のかなりの部分からそれらを分離することを妨げると心配されていた。事実、自発的活性化が起ると、作られた血小板因子（それは可溶性である）が、他の血漿生成物とともにフィルターを通過するか、又は活性化剤により誘発される活性化段階以前に精製の目的で場合により用いられる水洗前にフィルターを通過する。そしてこの場合は、この活性化段階は効果のないものとなる。なぜならそれは、手遅れであるか又は非常に低い収率においてのみ血小板因子を得ることを可能にするからである。

実際に、今、驚くべきことに、市販のフィルターを含む多くの公知のフィルターを用いて、血小板因子の著しい損失をもたらす自発的活性化を観察することなしに血小板をフィルター上に保持できることが判った。適したフィルターは、単純な日常試験により決定できる。フィルター上に血小板を保持した後に、活性化剤を用いて活性化を引き起こす前に、血小板因子のひどい損失なしに、予備洗浄を行うことさえできることが判った。このようにして、血漿の構成成分を少ない割合でのみ含んでいる精製した血小板因子調製物を得ることができる。

本発明の他の主体は、単純な方法で、既に記述した方法を行うことができる装置である。この装置は、閉鎖系の形態で提供され、血小板懸濁物を含む液体から始めて、血小板を活性化し、血小板因子の溶液を滅菌した状態で得ることができる装置であって、該装置は、血小板を保持できるフィルターを有する濾過手段を含み、該フィルターは囲い中に配置され、該囲い中で上流部及び下流部の境界を画し、該囲いの上流部は、開始液を含む貯留部に該上流部を連結しているか或いは連結可能にする、適当な開閉手段を備えた少なくとも1つの管と連結しており、そして、該囲いの下流部は、開始液の濾液及び該血小板因子の溶液を継続的に回収することを可能にする、適当な開閉手段を備えた少なくとも1つの管と連結しており、かつ血小板活性化剤を含む貯留部を更に含み、該貯留部は、該上流部中に溶液の形態で活性化剤を導入できるように該上流部と連結されているか或いは連結され得るものであることを特徴とする。

このようにして、本発明の装置は好ましくは、適した貯留部中の溶液の形態で或いは粉末の形態（特にトロンビンの場合）で活性化剤を有する、すぐ使用できるキットの形で供給される。後者の場合は、活性化剤の溶液は、粉末に適当な液体ビヒクルを加えることによって再構成される。液体ビヒクルは、コンパニオン（companion）バッグ中に

含まれた滅菌ビヒクルであり得る。活性化剤溶液はまた、慣用の液体ビヒクルで再構成され得るか又は使用時に調製され得、滅菌は、活性化剤溶液を搬送するための管に滅菌フィルターを備えることによりもたらされる。洗浄溶液は、同様の方法により処置され得る。

更に詳しくは、本発明は、活性化された血小板の上清(12)を得ることができる装置に関し、該装置は、血小板を保持するフィルター(5)を含み、該フィルター(5)は、その一方、すなわち上流において、液体(15)中の懸濁物に含まれる血小板を搬送するための第1の手段(2)及び血小板活性化剤の溶液(7)を搬送するための第2の手段(4)に連結されており、そして他方、すなわち下流において、該懸濁液体(13)を排出するための手段(8)及び、該上清(12)を回収するための手段(9)に連結されており、該それらの手段を、適当な手段(6)により可逆的に閉じることができる、ことを特徴とする。

上記装置は、好ましくは、上流において、洗浄液(14)、特に補助薬を含むことができる緩衝洗浄液を搬送するための手段(3)に連結され、そして、下流において、使用済洗浄液(16)を排出するための手段(10)に連結されている集成装置により完全となる。

この装置においては、液体中の懸濁物に含まれる血小板及び血小板活性化剤の溶液、そして場合により洗浄液を搬送するための該手段は、それぞれ該血小板懸濁液、該血小板活性化剤溶液及び該洗浄液を含むためのそれぞれの貯留部と連結された管であり、該排出手段は、それぞれ濾過後の血小板の懸濁液及び洗浄液を含むための受け器に連結された管であり、該回収手段は、活性化された血小板の上清を含むための受け器と連結された管である。

本発明に従った装置は一般に一回の使用を予定しているので、好ましくはそれぞれ1又は多数の単純な、場合により並置した移動バッグ又は注射器（それらはともに使い捨てである）を含む複数個の貯留部及び受け器を用いる。閉じるための手段は、変形しうる医用グレードのプラスチック、例えばポリエチレンで作られた管を押さえつけるクランプである。

これらの装置は、バッグの内容物によるフィルターの汚染を避けるためにフィルターをバイパスするための手段により完全となり得、そして、上清を回収するための手段は、上清のウィルス負荷(viral load)を減少するための手段に連結されている。

種々の液体は、好ましくは、重力又は蠕動タイプのポンプシステムによって搬送され、例えば、そのシステムは閉鎖されそして滅菌されている。

既に示したように、血小板を含む懸濁液は、好ましくは、ヒト或は動物由来の全血、又は血小板を含む血液画分の一つ特に血漿又は血小板に富んだ血漿である。

血小板活性化剤の溶液は、好ましくは、水性溶液である。

本発明に従った装置は、完全な滅菌条件下でかつ自家移植の用途に適合するコストで、活性化された血小板の上清を得ることができるものである。

本発明に従った方法及び装置の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明の記述及び添付の図面を参照することにより明らかになる。

図面の説明

第1図は、本発明の装置の特定の具体例の概要を表わしている。

第2図は、以下の実施例6に記載した、フィルターシステムの特定の具体例の概要を表している。

本発明の装置(1)は、図1に示されたように活性化された血小板の上清を得ることを可能にする。

血小板を保持するためのフィルター(5)は、装置の中心部を構成する。濾過システムは、例えば、ディプスフィルター(depth filter)又は微孔質フィルターを含むことができる。濾過は、正面又は接線であり得る。

ディプス濾過のためのシステムは、例えば、球状濃縮物から白血球を除くために用いられる不織ポリエステルフィルター（Organon Teknika社（フレスネス、フランス）製のErypur Optima G-0及びG-2フィルター、Pall Biochemical（パリ）製のPall RC100及びRC50フィルター、アサヒ メディカル（フランクフルト／マイン、ドイツ）製のSepacell R500フィルター）を含むことができる。それらの特徴及び使用に従い、これらのシステムは血小板の50%から100%を保持する。血小板を保持するために特に設計された他のフィルター材料も公知である（ヨーロッパ特許第３１５０２２号）。

微孔質濾過システムは、例えば、図2に示されている中空ファイバー(20)のカートリッジ(21)(A/G Technology Microgon, Gambro, Enka, ヨーロッパ特許第１１６６２６号のカートリッジ）であり得る。微孔質材料を通る濾過は、例えば、接線的に行われる。接線濾過を行うために、管(19)を繊維(20)の両端に連結させる。ポンプ、例えば、蠕動ポンプ(18)は、この管と組み合わせることにより、フィルター繊維内での保持物質の循環を提供する。ポンプ例えば蠕動ポンプ(17)に備えられ、そして、上流部でかつ(19)で管に連結されている管(22)は、濾過されるべき溶液の(19)への搬送を可能にする。カートリッジ(21)に連結された管(23)は、フィルターの排出口を構成する。

このフィルター(5)は、上流にて、搬送手段(2)によって、懸濁された血小板を含む生物液体(15)を有する受け器に連結されており、該液体は、血小板に富む血漿、軟層(buffy coat)、標準血小板濃縮物又は、一単位の血小板濃縮物であり得る。

フィルター(5)はまた、上流にて、搬送手段(3)により、血小板活性化剤(7)の溶液を有する受け器に連結されている。活性化剤は、トロンビン、アデノシン二リン酸、コラーゲン又はカルシウムイオン透過担体A23187であり得る。

フィルター(5)は、追加的に、下流において、排出手段(8)により、懸濁された血小板を含む生物液体(13)受ける

受け器に連結されて[illegible]フィルター(5)はまた、回収手段(9)により、活性化された血小板の上清(12)を受ける受け器に連結されている。

この装置に、血小板を洗浄するための液体(14)を搬送する手段(3)を加えることが可能であり、使用済液体(16)はそれを受けるための受け器中に排出手段(10)により排出される。

(15)、(14)、(7)、(8)、(13)、(16)及び(12)を含む貯留部及び受け器は、例えば、移動バッグ(例えば、血液生成物を集めるために一般に用いられる柔軟性のある移動バッグ)である。搬送手段及び排出手段はそれぞれ、管であり得る。それぞれの管は、例えばクランプを用いて閉じられ得る。

この装置のすべての構成部品は、閉鎖された循環路(バッグ、管、ニードル、コネクター、フィルター、溶液)を形成し、該循環路は使用前に、適当な手段により滅菌され得る。

本装置の使用の態様の一つを以下に示す。

管(3)、(4)、(9)及び(10)は閉じる。懸濁された血小板(15)を含む容器は、フィルター(5)を通り、回収バッグ(13)へと重力により(又は、管又は空にされるべきバッグを絞る機構をもつポンプシステム又は滅菌されたシリンジピストンの使用により)空にされる。管(2)及び(8)を閉じる。管(3)及び(10)を開ける。洗浄液(14)は重力により、フィルター(5)を通過した後、使用済洗浄液(16)を受けるバッグへと[illegible]される。管(3)及び(10)を閉じ、そして、管(4)及び(9)を開く。バッグ(7)は、重力により空にされ、そして、得られた上清(12)は、バッグ中に集められる。次いですべての管を閉じる。

接線濾過システムを用いる場合は、蠕動ポンプ(17)は、(15)、(14)又は(7)を管(19)の方へ搬送する。(19)上の蠕動ポンプ(18)は、フィルター繊維中の保持物の再循環を提供する。蠕動ポンプは、前段落で記載したすべての操作の間中、動いている。

この装置はある種の変更も可能である。例えば、以下のような変更を挙げることができる。

a) フィルターをバイパスするための、ブロッキング装置を含む管(11)を、フィルターをパージするため、又は、(15)、(14)或いは(7)の一部がフィルター上に流れ出すのを防ぐために追加できる。例えば、全血は注射器中で遠心されることができ、注射器のオリフィスは、(15)を含んでいるバッグの代りに連結されることができ、注射器中に沈殿された赤血球はバイパス中に押し出され、そして、上清血漿は、フィルターを通して押し出されることができる。

b) (16)の収集を(13)のための収集バッグ中で行うことができる。

c) 上清(12)を集めるためのバッグは、例えば血小板上清を治癒補助薬又は安定化剤に富むようにするため或いは上清を決められた割合に希釈するために、いかなる性質の添加剤も含み得る。

d) いずれのバッグも、様々な装置、例えば、試料採取部位を備えられることができる。

e) 上清(12)を回収するためのバッグは、試料採取部位を備えられて完成されることができ、又は閉鎖循環路において、長期間処理の間に生成物の使用に合うように分配することを可能にするように、より小さいバッグと連結されうる。管のコネクターは混合、分離そして分配操作に適した任意のデザインの滅菌した集成装置を作るための公知の溶接装置によって、滅菌的に作り得る。

f) 上清(12)は、公認された条件下で、水浴中に浸漬することによる低温殺菌法、抗体中和、或いは濾過(Millipore (Bedford, U.S.A.)によって開発されたVirosolveシステム；アサヒシステム、Pallシステム)、又は処理生成物の十分な活性を保持しながらウィルス負荷を減少させるのに効果があるその他の任意方法により、ウィルス不活性化の段階にさらすことができる。ウィルス不活性化のシステムは、上述の装置と一体結合されて、その結果、該装置の閉鎖性が維持されるように製造し得る。

g) 血小板の上清のある種の分子を特異的に保持する基質が、生物分子の直接精製工程を行うために、上清(12)を集めるためのバッグの上流又は下流に取り付けられ得る。 一般に、いずれの装置も、該システムの閉鎖性を維持する限りにおいて追加され得る。

本発明を以下の実施例により説明する。(1)～(16)の数字は、図1を指し、(17)～(23)の数字は図2を指す。

<u>実施例1</u>

a-400 ml容の移動バッグ(Baxter、照会番号R2074)を、無菌的に350 mlの0.04 M Tris. HCl(pH 7.4),0.15 M NaCl溶液(14)で満たす。

b-同じバッグを250 mlの同じ溶液で満たし、そして、1250 NIH Uのウシトロビン(Roche、照会番号0728462)(7)を加える。

c-すべての管をクランプで締めた後、Optima G2 フィルター(Organon Teknika, フレスネス、フランス)を、滅菌雰囲気下にて、その赤い上流端で、a-に記載のものと同じタイプの移動バッグ中に含まれている5つ標準血小板濃縮物の混合物(15)と連結する。

d-フィルターの白い上流端を(7)を含むバッグに連結する。フィルターは、下流に1及び2と番号が付された2つの移動バッグを含むように作られている。当該2つの移動バッグは、それぞれ1つは(12)を集めるために、そして他は(13)及び(16)を集めるために用いられる。

e-(15)を含むバッグは、5～50cmもち上げられ、そしてバッグ2は同じ高さ分、フィルターから低められる。

f-管(2)及び(8)を開ける。血漿(15)はバッグ(2)に10±5分間かけて流れ込む。

g-管を再び閉じる。

h-(15)を含んでいたバッグを滅菌雰囲気下ではずす。(14)を含んでいるバッグを、(15)を含んでいたバッグの

代りに連結する[illegible]、f及びgに記した操作を繰り返す。

i-管(4)及び(9)を開け、そしてe、f及びgに記した操作を繰り返す。

j-次いで、管(9)を溶かすことにより閉じ、切断する。

最初に、(15)は、243 mlの血漿中に318 $\times 10^9$ の血小板を含む。操作後、(15)及び(16)は13.65 $\times 10^9$ の血小板を含む。従って、フィルターは血小板の95.7%を保持していた。

(12)について行った分析の結果を表1に示す。

トロンビンは、同等のＡＤＰ溶液により代えることができる。

実施例2

装置を、以下の変更を行い、実施例1と同様にして準備し、用いる。(14)は400 ml量の緩衝液を有し、(15)を含むバッグは3つの血小板に富んだ血漿の混合物で満たされた800 ml容の移動バッグ(Fenwal, 照会番号R053)である。バッグ2の内容物(13)は、血漿の濾過の間連続的に、バッグ2に連結された付属の800 ml容のバッグに移される。濾過後、(14)はフィルターを通ってバッグ2に入り空にされる。

最初に、(15)は、782 mlの血漿中に198.6 $\times 10^9$ の血小板を含む。操作後、(13)及び(16)を合わせると14.4$\times 10^9$の血小板を含む。従って、フィルターは96.5%の血小板を保持していた。(12)について行った分析結果を表Ｉに示す。

実施例3

装置を、以下の変更を行い、実施例1と同様にして準備し、用いる。(14)は360 ml量の緩衝液を有し、(15)を含むバッグは、3つの白血球／血小板濃縮物（又は軟層）(15)の混合物を含む。

最初、(15)は125 $\times 10^9$ の血小板を含む。操作後、(13)及び(16)を含むバッグ2は、4.8 $\times 10^9$ の血小板を含む。従って、フィルターは、96.16 %の血小板を保持している。

(12)について行った分析結果を表Ｉに示す。

この実施例は、本発明の方法を用いて、白血球／血小板濃縮物から始めた場合でさえ、血漿タンパク質の大部分を除くことができることを示している。血漿は、10億の血小板当り少なくとも約0.3 gの遊離タンパク質を含むということが思い出される。

実施例4

装置を、以下の変更を行い実施例1と同様に準備し、用いる。(14)を含むバッグは、464 mlのHepes (12 g/l)、NaCl(5.8 g/l)、グルコース(5.4 g/l)、KCl(0.25 g/l)緩衝液(14)を含み、そして(7)を含むバッグは、221 Uのヒトトロンビンの入った221 mlの同じ緩衝液(7)を含む。

操作の全時間は36分間であり、これは標準血小板濃縮物の濾過のための7分間、フィルターを洗浄するための14分間（(14)の流れ）、及び血小板の活性化のための10分間（フィルター(5)を通る(7)の流れ）を含む。血小板の98%がフィルターに保持されている。

(12)について行った分析結果を表Ｉに示す。

実施例5

以下の集成装置を準備する。Sepacell R-500B1フィルター（アサヒ）を、上流及び下流にて、SCD II B装置(Du Pont)を用いて、閉鎖装置及びパーホレーターを備えた3方向アダプターに連結する。6つの400 ml容バッグ(Baxter, 照会番号R2074)を、それぞれのパーホレーター上に相次いではめ、図1に記した装置を作る。下流に配置されそして(12)、(13)及び(16)を集めるためのバッグを空にする。上流の移動バッグの一つに含まれた(15)は、5つの標準血小板濃縮物の混合物である。第2の上流の移動バッグ中に含まれた(14)は、447 mlの実施例4に記載したHepes緩衝液からなる。第3の上流の移動バッグ中に含まれた(7)は、245 Uのヒトトロンビンを含む、245 mlの同じ緩衝液からなる。

濾過、洗浄及び活性化の操作は、実施例1に記載した操作と同様の方法で行う。

装置のすべてが完全に閉鎖されているので、操作はすべて、無菌雰囲気の外で行われる。

操作の全時間は、41分間である（濾過のための7分間、洗浄のための11分間及び活性化のための12分間を含む）。

フィルターは、血小板の89%を保持した。

(13)は、血小板が激減した血漿175 ml、すなわち、濾過された血漿の全量を87.5%を含む。

(12)について行った分析結果を表Ｉに示す。

実施例6

以下の集成装置を準備する。PF2000中空ファイバー(Gambro)を有するカートリッジを管に連結し、図2に記載のフィルターシステムを作る。(22)は、管(2)、(3)及び(4)に連結されている。(23)は、管(8)、(9)及び(10)に連結され、図1に記載の装置を成す。上流の移動バッグの1つに含まれる(15)は、血小板に富んだ血漿の混合物である。第2の上流の移動バッグ中に含まれる(14)は、実施例4に記載のHepes緩衝液740 mlより成る。この第2の上流のバッグは、追加的に、洗浄操作の最後にシステムをパージするために、約200mlの滅菌空気を含む。第3の上流の移動バッグに含まれる(7)は、2000 Uのヒトトロンビンが加えられた同じ緩衝液450 mlから成る。蠕動ポンプ(17)は連続的な22 ml/分の流れを提供し、蠕動ポンプ(18)は、連続的な、80 ml/分の流れを提供する。

濾過、洗浄及び活性化の操作は実施例1に記載の操作と同様な方法により行なわれる。

装置のすべてが完全に閉鎖されているので、操作はすべて、無菌雰囲気の外で行われる。

上記操作の結果、血小板は(12)、(13)及び(16)中には検出されない。それ故、フィルターは、すべての血小板を保持した。

(12)について行な[illegible]析結果を表Ⅰに示す。

<u>実施例７</u>

中空ファイバー(A/G Technology)を有するカートリッジを用いた。穴が0.2 μm、繊維の内径が0.75mm、全濾過面積が0.009 m^2である。このようなフィルターは、バクテリアを保持するので滅菌フィルターとなり得る。集成装置を、ポンプ(17)を省いたことを除いては図２に示された通りに構成する。ポンプ(18)の流速は、130 ml/ 分である。開始物質は、195 ml量の血小板に富んだ血漿である。用いた他の物質は、実施例６に記載したそれと同じである。

操作は、上記実施例６に記載したそれとほぼ同じ方法により行った。

結果は、

10億の血小板当り、β・トロンボグロブリン：50.3 μg

集めた血小板抽出物の量：156 ml

使用済洗浄溶液の量：184 ml。

洗浄溶液は、血小板抽出物中に含まれたβ・トロンボグロブリンの全量の１％未満(0.89 %) を含む。このことは、洗浄操作の間血小板の早期活性化が起こっていないということを意味する。

トロンビンは、ＡＤＰによって置き代えられ得る。

<u>慣用の方法と比べての本発明の利点</u>

実施例に示された結果より以下の利点を規定できることが明らかである。

<u>時間の節</u>[illegible]慣用の方法の最小時間60分間に代わり、血小板に富んだ血漿の作成からの全時間は30～45分間である。

<u>滅菌性</u>：血小板の活性化による生成物は、閉鎖循環路中で得られる。それ故、外部から生じる汚染の危険を排除している。

<u>作業者の保護</u>：血液及びその由来物は、潜在的に危険である。作業者は、血液生成物に直接接触しない環境下に置かれ得る。

<u>使用の容易性</u>：操作の数が、著しく減った。操作は、閉鎖循環路においての、液体を移動する単純な操作に減った。

<u>最小の設備投資</u>：保護された又は滅菌された囲いは必要なく（フード、グローブボックス、10.000クラス構成部品を省ける）、そして、遠心機及び様々の使いすての部品と試験管を省ける。

<u>良好品質の最終製品</u>：血小板は、連続遠心分離による洗浄に比べ、はるかに多量で洗浄される。その結果血漿タンパク質は、はるかに低い濃度で存在する。更に、フィルター上に保持された血小板残留物は、最終製品を汚染しない。

<u>高収率</u>：特にβ・トロンボグロブリン及びトランスフォーミング成長因子・βは、より短い操作時間及び血小板の部分的脱顆粒を引き起こす遠心分離がないので、収率が高い。

<u>血漿の良好な回収</u>：開始血漿の少なくとも85%が滅菌された状態で回収され他の目的に使用され得る。

<u>全血又は、副分画例えば白赤球／血小板濃縮物を、直接用いることが可能。</u>フィルターが血小板を特異的に保持し、赤血球を保持しないフィルターであるため。

この一連の利点は、活性化された血小板の上清を調製することにおいて、特に有利な性質を本装置に与えている。

本発明によって得られた製品の用途は、血小板の上清の用途であり、例えば、

－血小板由来分子（トランスフォーミング成長因子・β、血小板由来成長因子等）の、研究、試薬の製造、治療の用途をもった活性薬の製造、又はその他の目的のための精製、

－治療又は化粧品の用途をもった調製、特に組織修復、例えば皮膚治療の補助薬の製造、

－個人の血小板顆粒の含量を評価することを目的とした、診断又は予後（診断）の用途を有する分析試験の実施である。

表Ⅰは、実施例１～６に記載の操作において得られた活性化された血小板の上清について行った分析結果、及び、国際公開ＷＯ８６／０３１２２号公報に記載の手順に従って行った一連の10の操作において得られた結果の平均値を示す。

表　Ⅰ

	ﾀﾝﾊﾟｸ 質(1) μg/10^9Tbr*.	β-TG (2) μg/10^9Tbr.	PDGF (3) ng/10^9Tbr.	TGF-β μg/10^9Tbr.	ﾐﾄｹﾞﾝ 活性 /10^9Tbr.
実施例１	75	67	17.4	1.6	44
実施例２	151	60.4	11	1.7	32.2
実施例３	2160	68.8	15	2	48
実施例４	138	20	10.6	0.8	18
実施例５	62.4	11	7.6	1.1	17.2
実施例６	742	9.2	8.1	2.9	5.1
WO86/03122に従った例	219	38	39	1.4	34

＊Thr.：血小板

(1) Bradford法(Biorad 試薬、参照番号 500-0006)により決定した。

(2) β・トロンボグロブリン（β-TG ）は、ELISA 定量試験(Stago、参照番号 0419)により決定した。

(3) 血小板由来成長因子(PDGF)は、ELISA 定量試験により決定した。

(4) トランスフォーミング成長因子・β(TGF- β）は、60℃で10時間加熱した後、寒天上でのクローニング試験(Assoianら、J. Biol. Chem.,第258巻、第7555頁、1983年）により決定した。

(5) ミトゲン活性の値は、24時間誘導後に、集密状態(confluence)に培養した３Ｔ３　クローン　Ａ３１細胞によるトリチウム標識されたチミジンの最大取込みの半分を引き起こす試料の希釈度に相当する。

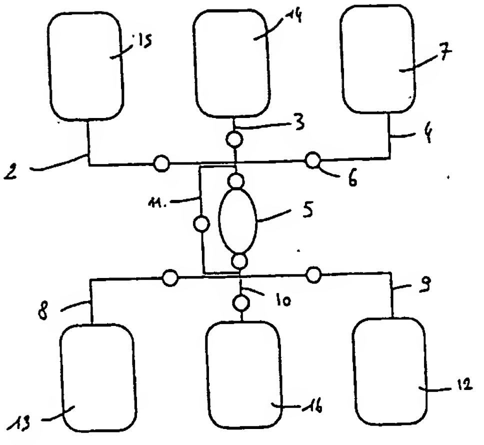

図 1

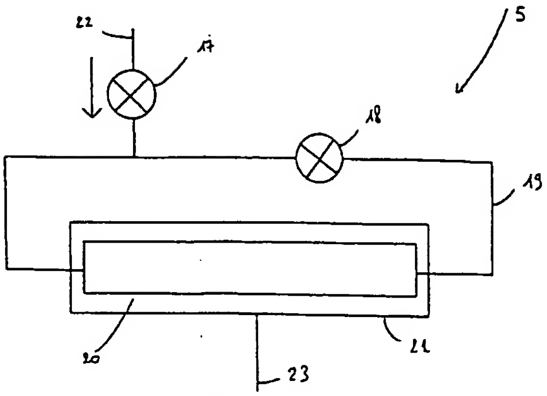

図 2

国 際 調 査 報 告

International application No. PCT/FR 93/00544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5 A61K35/14; A61M1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

[illegible]

Int.Cl. 5 A61K ; A61M ; C12M

[illegible]

[illegible]

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP,A,0 349 188 (ASAHI MEDICAL CO) 3 January 1990 see page 4, line 30 - page 5, line 58; figures 3,4,5 see page 6, line 44 - page 7, line 17 see page 9, line 35 - line 48 see page 10, line 44 - line 53 see page 11, line 35 - line 42 see examples 3,4 -.-	3,4 1,2
Y	US,A,4 360 435 (D. BELLAMY ET AL.) 23 November 1982 see column 3, line 44 - column 4, line 45 see claims; figure -.-	3,4

-/--

☐ [illegible] Box C. ☐ [illegible]

[illegible]

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 September 1993 (28.09.93)	4 October 1993 (04.10.93)
Name and mailing address of the ISA European Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国 際 調 査 報 告

International application No. PCT/FR 93/00544

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR,A,2 513 896 (COBE LABORATORIES INC) 8 April 1983 see claims; figures see page 9, line 4 - line 38 see page 12, line 12 - page 13, line 38 see page 17, line 24 - page 18, line 1 -.-	3,4
Y	WO,A,9 007 931 (CURATECH INC) 26 July 1990 see page 2, line 26 - page 3, line 15 -.-	1,2
Y	US,A,4 618 494 (J. V. ANGERS) 21 October 1986 see claims 1,2; example 1 -.-	1,2
X	US,A,4 410 630 (C.H. ZIERDT) 18 October 1983 see column 2, line 62 - column 3, line 46; claims; figures -.-	3
Y	WO,A,8 607 279 (C. BOURGEOIS ET AL.) 18 December 1986 see claims; figures see page 3, line 2 - page 6, line 34 -.- -.-.-.-.-.-	3,4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

調査報告

FR 9300544
SA 75831

28/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0349188	03-01-90	JP-A- 1320064	26-12-89
		JP-A- 1320065	26-12-89
		AU-B- 617265	21-11-91
		AU-A- 3671389	04-01-90
		US-A- 4985153	15-01-91
US-A-4360435	23-11-82	AU-A- 6484080	22-05-81
		AU-B- 535674	29-03-84
		AU-A- 6484180	22-05-81
		BE-A- 885877	16-02-81
		CA-A- 1149575	12-07-83
		EP-A,B 0038339	28-10-81
		WO-A- 8101248	14-05-81
FR-A-2513896	08-04-83	CA-A- 1198686	31-12-85
		DE-A- 3236310	21-04-83
		GB-A,B 2112293	20-07-83
		GB-A,B 2151941	31-07-85
		GB-A,B 2151942	31-07-85
		GB-A,B 2151943	31-07-85
		JP-A- 58070810	27-04-83
		NL-A- 8202703	02-05-83
WO-A-9007931	26-07-90	US-A- 4957742	18-09-90
		AU-A- 4964790	13-08-90
		EP-A- 0453498	30-10-91
		US-A- 5178883	12-01-93
US-A-4618494	21-10-86	CA-A- 1258631	22-08-89
US-A-4410630	18-10-83	US-A- 4435505	06-03-84
WO-A-8607279	18-12-86	FR-A- 2582960	12-12-86
		EP-A,B 0224538	10-06-87
		US-A- 4931185	05-06-90

国際調査報告

PCT/FR 93/00544

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION

CIB 5 A61K35/14; A61M1/36

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	A61K ; A61M ; C12M

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	No. des revendications visées
X	EP,A,0 349 188 (ASAHI MEDICAL CO) 3 Janvier 1990	3,4
Y	voir page 4, ligne 30 - page 5, ligne 58; figures 3,4,5 voir page 6, ligne 44 - page 7, ligne 17 voir page 9, ligne 35 - ligne 48 voir page 10, ligne 44 - ligne 53 voir page 11, ligne 35 - ligne 42 voir exemples 3,4	1,2
Y	US,A,4 360 435 (D. BELLAMY ET AL.) 23 Novembre 1982 voir colonne 3, ligne 44 - colonne 4, ligne 45 voir revendications; figure	3,4

-/-

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
28 SEPTEMBRE 1993	04.10.93
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	COUCKE A.O.M.

PCT/FR 93/00544

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	No. des revendications visées
Y	FR,A,2 513 896 (COBE LABORATORIES INC) 8 Avril 1983 voir revendications; figures voir page 9, ligne 4 - ligne 38 voir page 12, ligne 12 - page 13, ligne 38 voir page 17, ligne 24 - page 18, ligne 1	3,4
Y	WO,A,9 007 931 (CURATECH INC) 26 Juillet 1990 voir page 2, ligne 26 - page 3, ligne 15	1,2
Y	US,A,4 618 494 (J. W. ANGERS) 21 Octobre 1986 voir revendications 1,2; exemple 1	1,2
X	US,A,4 410 630 (C.H. ZIERDT) 18 Octobre 1983 voir colonne 2, ligne 62 - colonne 3, ligne 46; revendications; figures	3
Y	WO,A,8 607 279 (C. BOURGEOIS ET AL.) 18 Décembre 1986 voir revendications; figures voir page 3, ligne 2 - page 6, ligne 34	3,4

国際調査報告

FR 9300544
SA 75831

28/09/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0349188	03-01-90	JP-A- 1320064	26-12-89
		JP-A- 1320065	26-12-89
		AU-B- 617265	21-11-91
		AU-A- 3671389	04-01-90
		US-A- 4985153	15-01-91
US-A-4360435	23-11-82	AU-A- 6484080	22-05-81
		AU-B- 535674	29-03-84
		AU-A- 6484180	22-05-81
		BE-A- 885877	16-02-81
		CA-A- 1149575	12-07-83
		EP-A,B 0038339	28-10-81
		WO-A- 8101248	14-05-81
FR-A-2513896	08-04-83	CA-A- 1198686	31-12-85
		DE-A- 3236310	21-04-83
		GB-A,B 2112293	20-07-83
		GB-A,B 2151941	31-07-85
		GB-A,B 2151942	31-07-85
		GB-A,B 2151943	31-07-85
		JP-A- 58070810	27-04-83
		NL-A- 8202703	02-05-83
WO-A-9007931	26-07-90	US-A- 4957742	18-09-90
		AU-A- 4964790	13-08-90
		EP-A- 0453498	30-10-91
		US-A- 5178883	12-01-93
US-A-4618494	21-10-86	CA-A- 1258631	22-08-89
US-A-4410630	18-10-83	US-A- 4435505	06-03-84
WO-A-8607279	18-12-86	FR-A- 2582960	12-12-86
		EP-A,B 0224538	10-06-87
		US-A- 4931185	05-06-90

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C12M 1/00	Z	7417-4B	

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☑ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: ______________________

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.